操作マニュアル

加熱処理動物由来タンパク質検出キットシリーズ編

※取扱説明書と併用してご活用下さい。

【 はじめに 】

BSE（牛海綿状脳症）の発生防止を目的に「反すう動物用飼料への動物由来たん白質混入防止に関するガイドライン（平成 15 年 9 月 16 日付け農林水産省・安全局長通知)」により反すう動物用飼料に動物由来のタンパク質の使用・混入禁止が義務付けられるようになりました。

弊社は、独立行政法人肥飼料検査所と連携して、反すう動物用飼料への動物由来タンパク質混入検査用キットの研究開発を進め、第一弾として平成15年12月より「加熱処理牛由来タンパク質検査キット」を、第二弾として平成16年12月に「加熱処理鶏由来タンパク質検出キット」を発売しました。

これらのキットは農林水産省から飼料分析用検査キットとして使用可能である旨の通知がされています。本キットは、今回の法令改正を受けて、動物由来タンパク質の混入防止対策を推進する上で、製造管理及び品質管理のスクリーニング検査試薬としてご活用いただけるものです。

【 モリナガ加熱処理動物由来タンパク質検出キット 】

- モリナガ 加熱処理牛由来タンパク質検出キット (Cat.No.CJBHPA)
- モリナガ 加熱処理鶏由来タンパク質検出キット (Cat.No.CJCHPA)

【キットの特徴】

1. 簡単な操作で測定可能（マイクロプレートを使用した ELISA 法）
2. 短時間で測定可能（抽出操作 1～2.5 時間、ELISA 反応 3 時間弱）
3. 高感度で検出可能（配合飼料中 0.1% 相当の肉骨粉を検出可能）
4. 試料中の目的タンパク質を特異的に検出（特定タンパク質に対する抗体を使用）

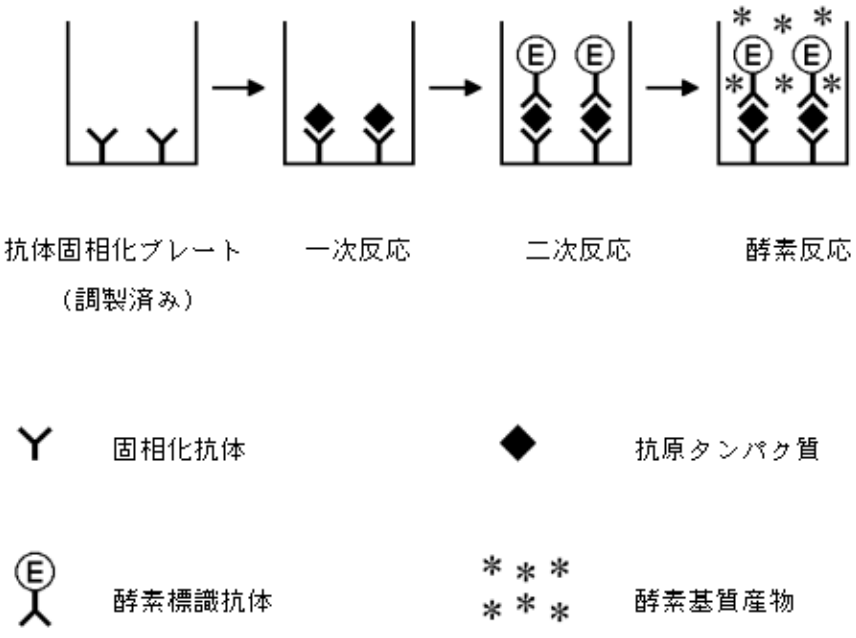
【測定原理】

一次反応：試料中の抗原タンパク質が、プレート上の固相化ポリクローナル抗体に結合し、［固相化抗体/抗原タンパク質］の複合体を形成する。

二次反応：酵素標識ポリクローナル抗体が複合体上の抗原タンパク質に結合する。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の複合体に結合した酵素により呈色する。

〈測定原理図〉



【 測定する際の注意事項 】

１．　試薬は全て常温(20-25℃)に戻してから使用して下さい。
２．　測定は二重測定で行って下さい。
３．　反応時間、反応温度は厳守して下さい。反応温度は常温(20-25℃)です。
４．　標準溶液および検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないよう注意して下さい。ピペットマン等のピペッティング器具を使用する場合は、定期的に検定を行って下さい。
５．　実験に用いる器具類は汚染のないよう、使用前に十分洗浄してあるものを用いて下さい。吸光度にばらつきが出たり、バックグラウンドの上昇の原因になります。抽出液の調製には使い捨てのプラスチックピペットや 50mL 程度の使い捨てチューブなどを使用すると汚染は防げます。またウェルへの分注の際に用いるピペットチップはフィルター付きのものを使用して下さい。
６．　測定は埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。微量の汚染を防ぐため、各操作後は必ず付属のプレート用ふたをして下さい。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
７．　各反応終了後の**洗浄操作は非常に重要**です。ウェル内に液が残存していないことを十分確認しながら洗浄操作を行って下さい。その際、ペーパータオルなどを使用してよく叩いて水切りを行って下さい。洗浄後は速やかに次の試薬を分注して下さい。
８．　酵素反応は遮光下で行って下さい。
９．　プレートの底はなるべく触れないようにして下さい。もし指紋等で底面が曇った場合はきれいに拭き取ってから吸光度を測って下さい。
１０．　反応停止液に１N硫酸を使用していますので、手や目、粘膜、衣服等に付かないようご注意下さい。誤って付着した場合はただちに大量の流水で洗い流して下さい。また、医師の指示に従って下さい。

【 使用方法 】

〈 検体抽出・調製のフローチャート 〉

（ 試料の均質化） □ 試料をミルサー等で粉砕均質化します。
↓
（ 抽出） □ 均質化したサンプル２ｇ測り取ります。
↓
□ 抽出液 18ｍＬを加えてミルサーもしくは
ホモジナイザーで抽出を行います。
(試料 4ｇに抽出液 36ｍＬでも可)
30秒間、３回繰り返します。
↓
□ 100℃水浴中で、10分間加熱します。
↓
（ 遠心分離） □ 3,000× ｇで 10分間遠心分離し、上清を分取します。
↓
（ ろ過） □ 上清をろ紙でろ過します。
↓
（ 抽出液） □ ろ液（検体抽出液）をそのまま検体とします。

〈 測定のフローチャート 〉

（ 検体の準備） □ 抽出液、洗浄液を調製し、標準溶液、および検体を準備します。
↓
（ 一次反応） □ 標準溶液、検体（ 100μＬ/ウェル）
*測定は二重測定で行います。
↓
□ 一次反応（ 常温、2時間）
↓
（ 二次反応） □ 洗浄（ 300μＬ/ウェル、6回）
↓
□ 酵素標識抗体溶液（ 100μL/ウェル）
↓
□ 二次反応（ 常温、30分）
↓
（ 酵素反応） □ 洗浄（ 300μL/ウェル、6回）
↓
□ 酵素基質溶液（ 100μL/ウェル）
↓
□ 酵素反応（ 常温、10分） *反応中は遮光します。
↓
（ 反応停止） □ 反応停止液（ 50μL/ウェル）
↓
（ 測　定） □ 吸光度測定（ 主波長：450nm、副波長：610～650nm ）

【試薬の調製法】

1．次の試薬はそのまま使用します。

A 抗体固相化モジュールを常温に戻してから開封して下さい。

開封後は直ちに使用して下さい。

C 陽性対照液 (加熱処理牛肉由来)

D 陰性対照液 (植物由来配合飼料抽出液)

E 酵素標識抗体溶液

I 酵素基質溶液

J 反応停止液

標準品原液、陽性対照液、陰性対照液、抽出液 I は特殊な臭いがします。

2．抽出液の調製 (標準溶液の調製及び検体の抽出に用います)

F 抽出液-I 50mL および G 抽出液-II 2.5mL を精製水で希釈し 1,000mL とします。

（抽出液-I を 20 倍希釈、抽出液-II を 400 倍希釈で必要量を調製して下さい。）

F 抽出液-I	・・・	50mL
G 抽出液-II	・・・	2.5mL
精製水	・・・	947.5mL
		1,000mL

精製水に抽出液を加えてください。抽出液 I と II を直接混ぜると沈殿が生じる可能性があります。

3．標準溶液の調製

B 標準品を上記 2 で調製した抽出液で希釈し、2 倍から 16 倍希釈までの標準溶液を調製します。

試薬の分注には、必ずフィルター付きチップを使用して下さい。

希釈溶液	×2	×4	×8	×16	Blank
B 標準原液	400	400	400	400	
抽出液	400	400	400	400	500

(単位：μL)

4．洗浄液の調製

H 洗浄液(20 倍濃縮液)50mL を精製水で希釈し 1,000mL とします。

H 洗浄液 (20 倍濃縮液)	・・・	50mL
精製水	・・・	950mL
		1,000mL

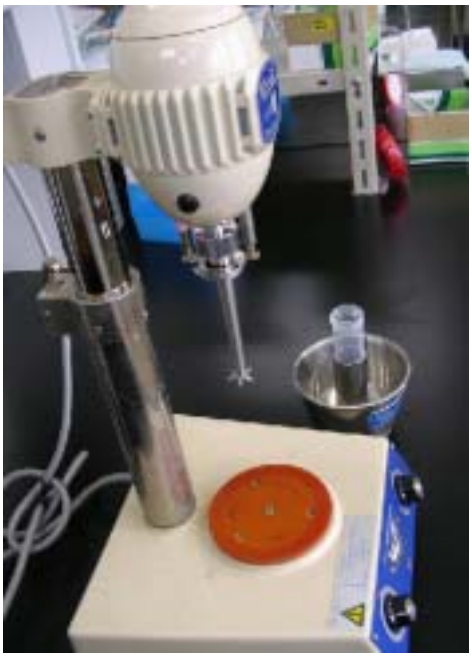
洗浄液は作り置き可能です。(1 週間以内)

【 検体の調製法・抽出法 】

1． 測定サンプルを均質になるようにミルサー等で粉砕します。

この操作における粉砕均質化が最も重要です。

2． 2g をとり、検体希釈液 18mL(F 20 倍濃縮抽出液-Ⅰおよび G 400 倍濃縮抽出液-Ⅱを精製水で希釈「抽出液の調製」参照)を加えてホモジナイザーもしくはミルサー等で 30 秒間攪拌します。この攪拌操作を 3 回繰り返す。



ホモジナイザーがなければ、4g を 36mL の抽出液でミルサーを用いた抽出でも同等の結果が得られます。

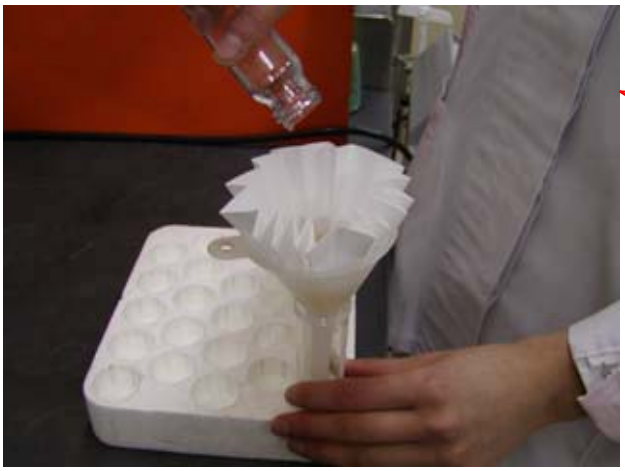
3．　沸騰水浴中で100℃、10分間加熱します。

サンプル液面まで水浴に浸かるようにして下さい。

4．　放冷後、3,000×gで10分間遠心分離し、上清を分取します。

流水中で放冷しても構いません。

5．　上清をろ紙でろ過し、検体とします。検体はそのままELISAに使用します。



ろ液に沈殿がある場合は、より目の細かなろ紙やフィルターを通して下さい。

サンプルは、抽出日当日に測定して下さい。

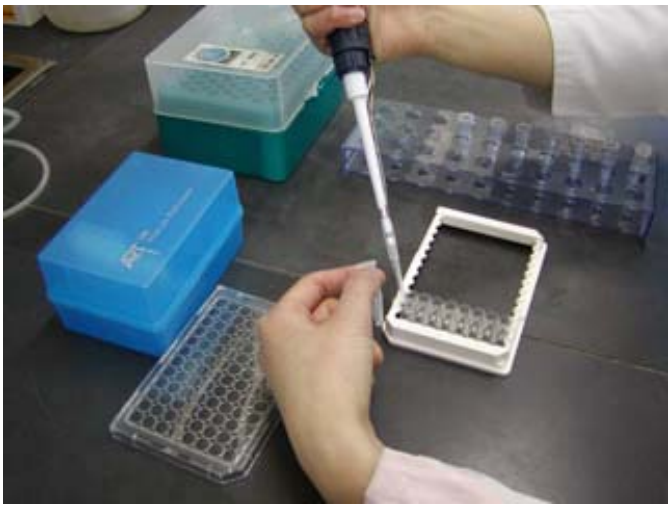
【 測定法 】

試薬は全て常温(20-25℃)に戻してから使用して下さい。

（ 一次反応 ）

1．A 抗体固相化モジュールを付属のモジュール用フレームにセットします。

2．各ウェルに標準溶液または検体を 100μL ずつ分注します。



ウェル上部なら、チップを付けてもかまいません。気泡が入らないよう注意して下さい。

フレームが動かないよう手で押さえると、分注しやすいです。

3．付属のモジュール用フタをして常温で正確に２時間静置して反応させます。

（ 二次反応 ）

1．ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300μL ずつの洗浄液で 6 回洗浄します。

ペーパータオル等にたたきつけるようにして、きれいに洗浄液を除いて下さい。

このような洗浄瓶を使うと、便利です。
（「便利な器具」をご参照して下さい。）

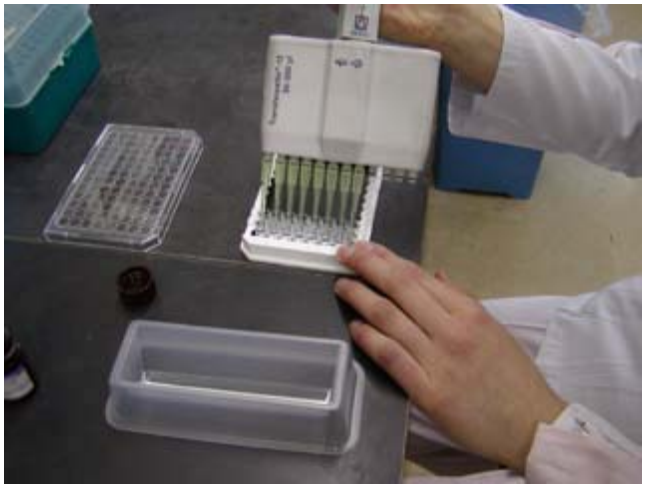
2．E 酵素標識抗体溶液を各ウェルに 100μL ずつ分注します。

3．軽く振盪フタをして常温で正確に 30 分間静置して反応させます。

（ 酵素反応 ）

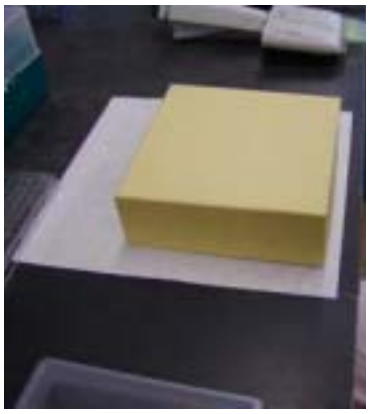
1．ウェル内の溶液を完全に除去し、再度、各ウェルあたり 300μL ずつの洗浄液で 6 回洗浄します。

2．I 酵素基質溶液を各ウェルに 100μL ずつ分注します。



洗浄後、モジュールの底面に液が付着している場合、よく拭き取って下さい。

3．フタをして常温遮光下で正確に 10 分間静置して反応させます。

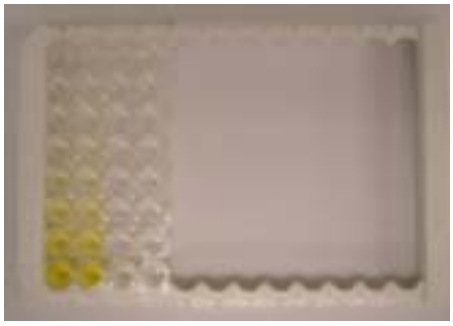


酵素反応は必ず遮光下で行って下さい。

4．反応停止液を各ウェルに 50μL ずつ分注し酵素反応を停止させます。

発色

目的タンパク質が存在する場合、青色に呈色します。



反応停止

黄色に変化します。

5．プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定します。

※ 酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定して下さい。

主波長 450nm
副波長 610-650nm
で測定して下さい。

測定前に、よくモジュール底面を拭いて下さい。

（ 判定 ）

1． 二重測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。

2． 試験成立条件

① 標準品８倍希釈液の吸光度平均値＜陽性対照溶液の吸光度平均値
＜標準品２倍希釈液の吸光度平均値

② 陰性対照溶液の吸光度平均値＜ 0.100

③ 陰性対照溶液の吸光度平均値 ＜ (Blankの吸光度平均値)×2

3．判定基準(サンプル検体の吸光度は平均しないで、個々で検討します。)

【 陽性 】・・二点のサンプル検体の吸光度 ≧ (陰性対照溶液の吸光度平均値)×2

【 陰性 】・・二点のサンプル検体の吸光度 ＜ (陰性対照溶液の吸光度)×2

【 再検査 】・・二重測定の結果、一方が陽性、一方が陰性となった場合

(測定例)

	1	2	Ave.
Blank	0.036	0.034	0.039
16倍希釈	0.092	0.096	0.094
8倍希釈	0.154	0.153	0.154
4倍希釈	0.244	0.255	0.25
2倍希釈	0.427	0.422	0.425
陽性対照	0.272	0.275	0.274
陰性対照	0.043	0.046	0.045
Blank	0.040	0.045	0.039

試験成立条件
① 0.154 < 0.274 < 0.425 **クリア**
② 0.045 < 0.100 **クリア**
③ 0.045 < 0.0392 **クリア**

サンプル	1	2	判定
a-1	0.072	0.065	-
a-2	0.064	0.070	-
b-1	0.153	0.161	+
b-2	0.201	0.217	+
c-1	0.046	0.051	-
c-2	0.086	0.097	再検査
d-1	0.287	0.275	+
d-2	0.309	0.331	+

※判定基準：陰性対照の平均吸光度(0.045)2 ＝0.090